

## **TREBALL DE RECERCA:**

# **DÈFICIT DE VITAMINA D I MALALTIA CARDIOVASCULAR ASIMPTOMÀTICA EN EL PACIENT AMB DIABETIS MELLITUS TIPUS 1**

**AUTOR:** Enric Serra Planas

**DIRECTOR DEL TREBALL:** Anna Lucas Martin

**CONVOCATÒRIA:** Setembre 2012

**DEPARTAMENT DE MEDICINA / UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

ANNA LUCAS MARTIN, professora del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona i Cap de Secció del Servei d'Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona.

FA CONSTAR,

que el treball titulat **“Dèficit de vitamina D i malaltia cardiovascular asimptomàtica en el pacient amb Diabetis Mellitus tipus 1”** ha estat realitzat sota la meva direcció pel llicenciat **Enric Serra Planas**, trobant-se en condicions de poder ser presentat com a treball d'investigació de 12 crèdits, dins el programa de doctorat en Medicina Interna/Diagnòstic per la Imatge (curs 2011-2012), a la convocatòria de Setembre d'enguany.

Badalona, a 30 d'agost de dos mil dotze.

# 1. ÍNDEX

1. Índex
2. Taula d'abreviatures
3. Resum
4. Introducció
  - 4.1. Dèficit de vitamina D
    - 4.1.1. Interferències en la biofotosíntesi cutània
    - 4.1.2. Malnutrició i malabsorció
    - 4.1.3. Obesitat i sobrepès
    - 4.1.4. Altres
  - 4.2. Diabetis Mellitus tipus 1 i risc cardiovascular
    - 4.2.1. Prevenció primària i cribratge de la malaltia cardiovascular en la Diabetis Mellitus tipus 1.
  - 4.3. Diabetis Mellitus tipus 1, risc cardiovascular i dèficit de vitamina D
    - 4.3.1. Diabetis Mellitus tipus 1 i dèficit de vitamina D
    - 4.3.2. Dèficit de vitamina D i risc cardiovascular.
5. Objectiu, material i mètodes
  - 5.1. Pacients
  - 5.2. Caracterització
  - 5.3. Mètodes
  - 5.4. Definició de conceptes
6. Estadística
7. Resultats
8. Discussió
9. Conclusió
10. Bibliografia

## 2. TAULA D'ABREVIATURES

- DM1: Diabetis Mellitus tipus 1
- PTH: paratirina
- 25(OH)D: 25-hidroxivitamina D
- 25(OH)D cor: 25-hidroxivitamina D corregida
- 1,25(OH)D: 1,25-dihidroxivitamina D
- RVD: receptor de la vitamina D
- CAC: calcificació arterial coronària
- CI: cardiopatia isquèmica
- MCV: malaltia cardiovascular
- MAC: malaltia arterial coronària
- ADA: *American Diabetes Association*
- FRCV: factors de risc cardiovascular
- SPECT: tomografia computeritzada de fotó únic
- UVB: ultraviolada B
- CPA: cèl·lules presentadores d'antígens
- HDLc: colesterol en lipoproteïnes d'alta densitat
- LDLc: colesterol en lipoproteïnes de baixa densitat
- ColT: colesterol total
- Tg: triglicèrids
- PCR: proteïna C reactiva
- HbA1c: hemoglobina glicosilada A1c
- $\text{Ca}^{2+}$ : calci sèric
- $\text{PO}^{3-}$ : fosfat sèric
- IMC: índex de massa corporal
- ECG: electrocardiograma
- DE: desviació estàndard
- A: anys
- UA: Unitats Agatston
- GG+: gammagrafia positiva

### 3. RESUM

La malaltia arterial coronària (MAC) és la causa primordial de morbidimortalitat en els pacients amb Diabetis Mellitus tipus 1 (DM1). El dèficit de vitamina D podria estar-hi relacionat per l'efecte regulador de la hormona sobre la renina i la resistència insulínica.

L'estudi té l'objectiu d'avaluar la relació entre la concentració de la vitamina D i la MAC precoç en pacients amb DM1 respecte un grup control no diabètic.

Es tracta d'un estudi transversal amb 150 casos i 50 controls. A la mostra (mitja d'edat  $38,01 \pm 7,81$  anys, 57% homes, 100% caucàsics) es determinaren paràmetres antropomètrics, bioquímics i radiològics com el *score* càlcic i la tomografia computeritzada de fotó únic (SPECT) de perfusió miocardiàca.

El 40,1% dels subjectes estudiats presentaren dèficit de vitamina D ( $< 20$  ng/mL), dels quals un 82,1% eren diabètics. Els diabètics i els fumadors presentaren una major proporció de dèficit ( $p = 0.038$  i  $p = 0.011$  respectivament). El 14,5% presentaren un *score* càlcic major d'1 i el 14,2% presentaren una gammagrafia alterada. No es detectaren diferències significatives entre *score* càlcic i SPECT entre casos i controls, ni entre deficitaris i no deficitaris de la vitamina.

Concloem que els DM1 presenten concentracions de vitamina D inferiors als no diabètics sense associar-se a un pitjor resultat de les proves de detecció precoç de MAC. El tabaquisme s'associa a una major alteració del *score* càlcic i al dèficit de vitamina D.

## 4. INTRODUCCIÓ

La vitamina D o calciferol va ser identificada el 1921 i es va denominar "D" per ser la quarta de la seva naturalesa en ser descoberta.

Les fonts de les quals l'organisme obté el precursor de la vitamina D, el colecalciferol, són principalment dues: en un 90-95% prové de la transformació cutània del colesterol per l'exposició a la radiació ultraviolada B (UVB) (290-315 nm) i en el 5-10% restant, prové de la ingesta. El colecalciferol, ja sigui obtingut a partir de la transformació cutània o bé mitjançant la dieta, ha d'experimentar dues transformacions per convertir-se en el metabòlit actiu (1,25-dihidroxitamina D (1,25(OH)D)). La primera d'elles, té lloc al fetge, mentre que la segona es localitza principalment al ronyó, encara que en estudis recents s'ha pogut comprovar que en la majoria dels teixits de l'organisme existeixen receptors i activitat enzimàtica per a aquesta segona transformació del colecalciferol. Això ens indica la gran complexitat de l'activitat exercida per aquesta hormona.

Les principals funcions estan relacionades amb el metabolisme fosfo-càlcic que regula juntament amb la paratirina (PTH) i la calcitonina. A nivell intestinal afavoreix l'absorció del calci i del fòsfat ingerits en la dieta i a nivell renal disminueix la calciúria. Unes concentracions disminuïdes d'aquesta hormona poden condicionar raquitisme, osteomalàcia, osteoporosi i un elevat risc de fractures.

A més té funcions no relacionades amb el metabolisme fosfo-càlcic, també denominades accions no calciotròpiques, que han centrat l'interès de la comunitat científica els últims anys. En diversos estudis s'ha observat que amb el dèficit existeix un increment del risc de desenvolupar diabetis mellitus tipus 1 (DM1) i altres malalties autoimmunitàries com l'esclerosi múltiple, l'artritis reumatoïdal o la malaltia de Cröhn. S'han correlacionat les concentracions disminuïdes de la hormona amb la diabetis mellitus tipus 2 (DM2), la síndrome metabòlica, la hipertensió arterial, les malalties cardiovasculars, les malalties infeccioses i el càncer com el de còlon, pàncrees, ovari, pròstata i mama, entre altres.

## 4.1 DÈFICIT DE VITAMINA D

Mil milions de persones a tot el món presenten deficiència o insuficiència de vitamina D.

Tot i que no hi ha consens, es consideren com a deficiència de vitamina D les concentracions circulants de 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) inferiors a <20 ng/ml; insuficiència quan resten entre 21 i 29 ng/ml i suficiència quan aquestes són iguals o superiors a 30 ng/ml.<sup>1</sup> Aquests punts de tall s'han establert atenent als nivells de PTH, l'absorció de calci i el risc de fractura.

### 4.1.1 INTERFERÈNCIES EN LA BIOFOTOSÍNTESI CUTÀNIA

Hi ha diversos factors que poden disminuir-ne la síntesi cutània, com ara:

- EDAT AVANÇADA:

La concentració cutània de 7-dehidrocolesterol, el precursor necessari per la síntesi cutània de vitamina D es redueix en un 75% a partir dels 70 anys.

- CREMES SOLARS:

Disminueixen eficaçment la radiació de UVB i, per tant, minva la producció cutània de vitamina D. Un factor de protecció de 8 disminueix la producció en més d'un 95% i, un factor de 15 més d'un 99%.

- MELANINA:

La melanina és un pigment natural extremadament efectiu que absorbeix la radiació ultraviolada C (200-280 nm) i competeix de forma similar amb el 7-dehidrocolesterol i la radiació UVB.

Els individus amb pell fosca que presenten major concentració de melanina en la seva epidermis són menys eficients en la producció d'aquesta hormona que els pacients amb pell clara. Una persona amb una tipologia de pell 5/6 (pell fosca que mai es crema), requereix una exposició solar de 10 a 50 vegades per produir la mateixa quantitat de vitamina D que una persona amb tipologia de pell 2 o 3.

- **LA CAPA D'OZÓ:**

És la zona de l'estratosfera que conté una concentració relativament elevada d'O<sub>3</sub>. Aquest gas absorbeix part de la radiació ultraviolada B.

En funció de l'angle de la llum solar o angle zenital, la radiació electromagnètica que compona el raigs solars ha de traspasar major o menor quantitat d'ozó. L'angle zenital està influenciat per múltiples factors com ara l'hora del dia, l'estació de l'any i la latitud. D'aquesta forma, quan l'angle zenital és més oblic (durant l'alba, el capvespre o durant l'hivern en latituds superiors a 35º) es redueix o fins i tot se suprimeix la producció de vitamina D.

#### **4.1.2 MALNUTRICIÓ I MALABSORCIÓ**

La vitamina D s'absorbeix principalment a nivell de l'intestí prim terminal. Hi intervenen molts factors com les secrecions biliars, gàstriques i pancreàtiques, la formació de micel·les, el transport a nivell de les vellositats intestinals i la pressió osmòtica.

La formació de micel·les és necessària per a l'absorció perquè la vitamina D és un esterol no polaritzat. Aquest procés s'inhibeix en les hepatopaties i insuficiències pancreàtiques exocrines on existeix una mala absorció dels greixos de la dieta i esteatorrea per una disminució de les secrecions biliars o pancreàtiques. Ja que la vitamina D és un compost liposoluble es perd amb les femtes d'alt contingut greixós d'aquests processos.

L'afectació de les vellositats intestinals, sobretot les localitzades a nivell de l'intestí prim terminal, que resulta de malalties com la de Cröhn, la fibrosi quística i l'esclerodèrmia també n'interfereixen l'absorció.

#### **4.1.3 OBESITAT I SOBREPÈS**

La prevalença de sobrepès i obesitat està augmentant de forma alarmant. Tot seguit se'n mostren algunes dades:

- Obesitat adults 14.5% i sobrepès adults 39% any 2000.<sup>2</sup>



- Obesitat adults 15.5% i sobrepès adults 39.2% any 2005.<sup>3</sup>
- Obesitat adults 22.9% i sobrepès adults 39.4% any.<sup>4</sup>
- Obesitat adults 28.2% any 2011.<sup>5</sup>

El dèficit d'aquesta hormona i l'obesitat es troben associades ben sovint. La vitamina D, com que és un compost liposoluble es diposita en les reserves de greix del cos tornant-se no biodisponible.

Paral·lelament, no hem d'oblidar que una de les opcions terapèutiques de l'obesitat mòrbida és la cirurgia bariàtrica per tècniques malabsortives. Aquest tipus de cirurgia pot condicionar una disminució de l'absorció dels greixos de la dieta per manca de temps d'acció dels àcids biliars. Aquest fet pot agreujar el dèficit en aquest tipus de pacient.

#### **4.1.4 ALTRES**

Altres factors com el sexe masculí, el tabaquisme i l'al·letament matern s'han associat a unes concentracions disminuïdes de 25(OH)D.

## 4.2 DIABETIS MELLITUS TIPUS 1 I RISC CARDIOVASCULAR

La prevalença de diabetis mellitus s'està incrementant ràpidament. L'augment de l'esperança de vida, la tendència a una vida sedentària, l'abundància d'aliments, les males pràctiques alimentàries i un progressiu percentatge poblacional de sobrepès i obesitat, estan implicades en l'increment de la DM2 que assoleix en el nostre entorn una prevalença del 12%.<sup>6</sup> Paral·lelament i per motius encara no ben determinats, la incidència de DM1 es troba també en augment.<sup>7</sup>

La diabetis s'associa a un major risc de complicacions microvasculars (retinopatia, nefropatia i neuropatia) i macrovasculars (cardiopatia, malaltia cerebrovascular i vasculopatia perifèrica).

Existeix controvèrsia sobre la magnitud del risc cardiovascular en aquests pacients. Mentre l'*American College of Cardiology* o l'*American Heart Association* han considerat la diabetis com un equivalent de MAC i la reconeixen com un dels factors de risc de coronariopatia més importants, múltiples estudis de cohorts han presentat resultats contradictoris a l'hora de comparar el risc coronari entre diabètics i pacients amb antecedents de cardiopatia isquèmica (CI).<sup>8</sup>

Concretament, en els pacients amb DM1 existeix un risc set vegades major de patir un succés cardiovascular respecte la població no diabètica i, la probabilitat de patir un segon esdeveniment cardíac és elevadíssima.<sup>9</sup> Tot i que resten sense identificar-se'n les causes concretes, existeixen múltiples hipòtesis que convergeixen en l'aparició d'una arteriosclerosi precoç.<sup>10</sup> Podrien estar-hi implicats mecanismes com ara:

- La disfunció endotelial, on intervenen processos com:
  - L'engruiximent de la íntima coronària.
  - L'excés de calcificació coronària.
  - Els canvis de la distensió arterial.
- L'estat inflamatori.
- La disfunció plaquetària.

D'aquesta forma la MAC apareix precoçment en els pacients amb DM1. Per exemple, durant l'adolescència, aquests pacients presenten un risc 10 vegades major de presentar malaltia cardiovascular (MCV) respecte la població general.

#### **4.2.1 PREVENCIÓ PRIMÀRIA I CRIBRATGE DE LA MALALTIA CORONÀRIA EN LA DIABETIS**

Es disposen de poques dades referents a la prevenció primària de la malaltia coronària en pacients amb DM1 pel que s'extrapolen els resultats d'estudis realitzats en pacients amb DM2. En ambdues malalties, l'*American Diabetes Association* (ADA) proposa unes recomanacions per a prevenció primària cardiovascular que inclouen: <sup>10</sup>

- HbA1c < 7.0%.
- Pressió arterial < 130/80 mmHg.
- Concentracions de LDLc < 100 mg/dL.
- Albuminúria < 30 mg/g de creatinina.
- Abandonament de tabaquisme.

Una altra eina àmpliament utilitzada són les taules de predicció clínica del risc arterial. Aquest instrument estima la probabilitat de presentar un succés cardiovascular, en un temps determinat i en funció de la presència o absència de determinats factors de risc cardiovasculars (FRCV). Actualment es considera que les taules REGICOR (Registre Gironí del Cor) o taules Framingham calibrades, són les millor validades per a la població espanyola.<sup>11</sup> Malgrat tot, no es recomana l'ús en pacients amb DM1 ja que l'estudi VERIFICA utilitzat per a la validació de les taules REGICOR inclou població major de 35 anys i una molt baixa representació de DM1 en el total de diabètics, pel què es podria infraestimar el risc cardiovascular en els pacients adults DM1.<sup>12</sup>

Hi ha certa controvèrsia en la necessitat d'un cribratge de la MAC en el pacient diabètic. Hi ha aspectes a favor i en contra:

- La MAC és la principal causa de morbiditat i mortalitat en pacients amb diabetis.
- Existeixen dades que recolzen una associació entre les estratègies de detecció intensives i la milloria de la isquèmia miocardiàica asimptomàtica.<sup>13</sup>
- No s'ha comprovat que la revascularització invasiva aporti millors resultats que el tractament mèdic intensiu en els pacients amb proves de detecció positives i

per tant, apareixen dubtes sobre quins canvis en el maneig es podrien oferir en cas d'un *screening* positiu.

- Actualment està molt qüestionada la relació cost-eficàcia de les estratègies de detecció indiscriminades.

A la guia de l'ADA del 2012 no es recomana el cribratge sistemàtic cardiovascular en els pacients asimptomàtics. Segons aquesta guia, els candidats a *screening* serien aquells amb: 1) presència de símptomes cardíacs típics o atípics i/o 2) electrocardiograma en repòs anòmal.

En els pacients amb DM1 coexisteixen habitualment varis FRCV fent necessària una intervenció dietètico-farmacològica energètica i precoç. Probablement, estaria justificada la realització de proves de detecció precoç en pacients que tinguin:

- Presència d'altres malalties arterioscleròtiques.
- Presència de complicacions cròniques de la diabetis:
  - Retinopatia diabètica.
  - La microalbuminúria i la reducció del filtrat glomerular causats per la nefropatia diabètica.
  - Disautonomia.
- Presència d'un electrocardiograma en repòs anormal.
- El sexe femení.
- Edat major a 65 anys.
- Un temps d'evolució de la diabetis de més de 15 anys.

Paradoxalment, el control glicèmic no semblaria estar massa relacionat amb l'evolució de les complicacions macrovasculars, no incloent-se com a criteri per a necessitat del *screening*.

Existeixen diverses proves de cribratge no invasives per a la detecció de la MAC silent. La tomografia computeritzada de fotó únic (SPECT) de perfusió miocardiàca és una prova àmpliament validada per a la detecció de la isquèmia miocardiàca. Consisteix en la valoració de la intensitat i localització dels defectes de perfusió de 99mTc-terofosmina tant en esforç com en repòs. Presenta una sensibilitat del 96% i una especificitat del 82%.<sup>13</sup>

Diversos estudis en pacients DM2 asimptomàtics han mostrat una major prevalença d'isquèmia miocardiàca respecte controls sans. Existeixen pocs estudis en pacients amb DM1.<sup>13</sup>

La calcificació arterial coronària (CAC) és un mètode més recent per a la detecció de l'arteriosclerosi coronària subclínica i s'ha convertit en un predictor de MCV. Per avaluar-la es realitza un TC multidetector d'alta resolució sincronitzat amb l'electrocardiograma (ECG) i apte per l'anàlisi i quantificació de calci. Aquesta mesura s'ha convertit en un factor predictiu independent donat que les puntuacions elevades es corresponen amb un major risc d'incidents cardiovasculars<sup>14,15,16</sup> i un resultat negatiu, o un *score* de calci de zero, s'associa amb una molt baixa taxa de mort o IM durant 3-5 anys (0,1%). Per tant, una puntuació de zero té un valor predictiu negatiu del 100%.

És una prova útil per al cribratge de pacients amb risc moderat (risc Framingham 10-20% en 10 anys).

## 4.3 DIABETIS MELLITUS TIPUS 1, RISC CARDIOVASCULAR I DÈFICIT DE VITAMINA D

El receptor de la vitamina D (RVD) està àmpliament distribuït per l'organisme humà. De fet, gairebé totes les cèl·lules nucleades expressen RVD encara que en concentracions variables. Moltes cèl·lules que tenen un paper crucial en el sistema cardiovascular expressen RVD com les endotelials, les musculars llises, els cardiomiòcits i les juxtaglomerulars de la nefrona productores de renina.<sup>17</sup>

Paral·lelament s'ha detectat que els pacients amb DM1 presenten unes concentracions menors de 25(OH)D que els pacients no diabètics.<sup>17</sup>

### 4.3.1 DIABETIS MELLITUS TIPUS 1 I DÈFICIT DE VITAMINA D

L'existència de RVD i 1-hidroxilasa en les cèl·lules presentadores d'antígens (CPA) i de RVD en els limfòcits T activats, CPA i en els timòcits va plantejar la idea que la 1,25(OH)D podria presentar funcions immuno-moduladores.

Assajos realitzats en els ratolins *non-obese diabetic* (NOD), un model àmpliament acceptat de DM1 humana, han demostrat que el tractament amb 1,25(OH)D disminueix al 8% la tendència a desenvolupar DM1 respecte el 56% del grup control no tractat.<sup>19,20,21</sup> Per aquests resultats la vitamina D és considerada un factor de risc genètic i ambiental de DM1.

Des del punt de vista ambiental, múltiples estudis epidemiològics avalen que hi ha una major proporció de diagnòstics de DM1 durant la tardor-hivern i que la probabilitat de desenvolupar DM1 és 400 vegades major en un nadó de Finlàndia (latitud 61ºN) respecte un de Venezuela (8ºN) per la diferent magnitud de radiació UVB.<sup>21</sup>

Genèticament es postula que les variacions al·lèliques del RVD podrien actuar com un factor de risc de DM1. En alguns estudis s'ha comprovat una correlació entre els polimorfismes d'aquest receptor amb les concentracions de 25(OH)D.<sup>16</sup>

#### **4.3.2 DÈFICIT DE VITAMINA D I RISC CARDIOVASCULAR**

El dèficit de vitamina D ha estat associat amb un increment del risc de CAD, de la mortalitat cardiovascular en pacients no diabètics<sup>23</sup> i amb l'increment de CAC en pacients amb DM1.<sup>16</sup> S'han postulat diferents mecanismes pels què les concentracions deficitàries d'aquesta hormona podrien incrementar la morbimortalitat cardiovascular:<sup>24</sup>

- Disfunció endotelial:
  - Disminució de la compliància vascular.
  - Tendència a la calcificació coronària.
- Estat proinflamatori.
- Alteracions a través de la PTH.
- Alteracions a través del sistema renina-angiotensina-aldosterona.

L'efecte directe de l'hormona sobre la paret vascular protegiria de l'arteriosclerosi inhibint la captació de colesterol per part del macròfag impedit la formació de cèl·lules espumoses, reduiria la proliferació de cèl·lules endotelials i inhibiria la cèl·lula juxtaglomerular en la formació de renina.<sup>25</sup> D'aquesta forma, el ratolí deficient amb RVD presenta hipertensió arterial, hipertròfia cardíaca i tendència a la trombosi.<sup>18</sup>

Malauradament, en múltiples assajos randomitzats i controlats no s'ha observat un efecte vasculo-protector a la suplementació oral amb vitamina D.<sup>26,27</sup> En un metanàlisi es va detectar l'associació d'un increment del risc de MAC<sup>28,29</sup> en context de suplementació amb calci sense coadministració de vitamina D i, per contra, ni la suplementació amb vitamina D<sup>29</sup> ni coadministració de calci/vitamina D es va correlacionar amb un efecte cardioprotector.<sup>27,29</sup> No existeix evidència que la suplementació amb vitamina D sigui un camí per a la milloria dels resultats cardiovasculars.<sup>30</sup>

## 5. OBJECTIU, MATERIAL I MÈTODES

L'estudi té l'objectiu d'avaluar les concentracions de 25(OH)D en els pacients amb DM1 asimptomàtics de la nostra àrea respecte un grup control no diabètic i correlacionar-les amb la presència de MAC precoç.

### 5.1. PACIENTS

S'inclogueren 150 pacients afectes de DM1 i amb més de 10 anys d'evolució de la malaltia que segueixen controls a les Consultes Externes del Servei d'Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona i de l'Hospital de Mataró. Paral·lelament es reclutaren 50 subjectes sans, aparellats per índex de massa corporal (IMC), sexe i tabaquisme per conformar el grup control.

#### CRITERIS D'INCLUSIÓ:

- Diagnòstic de DM1.
- Evolució de la malaltia superior a 10 anys.
- Edat compresa entre els 20 i els 50 anys.

#### CRITERIS D'EXCLUSIÓ:

- Antecedents personals o simptomatologia suggerent de cardiopatia isquèmica.
- Antecedents d'una altra complicació macrovascular com vasculopatia o malaltia cerebrovascular.
- Antecedents d'intervenció quirúrgica malabsortiva.
- Tipologia de pell de VI a IV.
- Tractament previ amb vitamina D o calci.



## 5.2. CARACTERITZACIÓ

De cada pacient s'han recollit els següents paràmetres:

### CLÍNICS:

- Edat i Sexe
- Talla, pes i IMC ( $IMC = \text{pes (kg)} / \text{talla}^2 \text{ (m)}$ )
- Tabaquisme (es considerarà com a fumador, els fumadors actius i els exfumadors).

### ANALÍTICS: (sang perifèrica en dejú)

- FRCV analítics clàssics (CoIT, HDLc, LDLc, Tg, PCR i HbA1c).
- Nivells de 25(OH)D.
- Determinació dels paràmetres bioquímics associats ( $Ca^{2+}$  i  $PO_3^-$ ).

### RADIOLÒGICS:

- SPECT d'esforç amb perfusió miocardiàca (únicament en els casos).
- *Score* càlcic.

## 5.3. MÈTODES

### PROVES DE LABORATORI:

- L'HbA1c:
  - S'ha mesurat en sang amb cromatografia líquida d'intercanvi iònic mitjançant l'analitzador ADAMS A1c 8160 (Arkray (Kyoto, Japan)).
- Els nivells de CoIT, HDLc, LDLc i Tg s'han determinat per mètodes enzimàtics estàndards.
- La PCR s'ha mesurat en sang amb nefelometria làser.
- Els nivells de 25(OH)D s'han determinat per cromatografia de masses.

#### PROVES DE CRIBRATGE CARDIOVASCULAR:

- SPECT d'esforç amb perfusió miocardiàica:
  - El pacient practica exercici físic amb una bicicleta ergomètrica. Inicialment amb una càrrega de 50 vats i amb un augment progressiu de 25 vats cada 3 minuts fins a l'esgotament, l'aparició de simptomatologia o fins al registre d'un descens del segment ST major de 0.2 mV.
  - Les adquisicions es realitzen amb una gammacàmera als 45 minuts de l'administració del radiofàrmac i són valorades visualment per dos experts en tres territoris: àntero-septal, inferior i lateral.
- SCORE càlcic:
  - S'obté mitjançant un TC multidetector d'alta resolució sincronitzat amb l'ECG per anàlisi i quantificació de calci utilitzant el software SOFT CALCIUM SCORING per SYMBIA T2 (Siemens).

## 5.4. DEFINICIÓ DE CONCEPTES

#### DÈFICIT DE VITAMINA D:

Les concentracions de 25(OH)D els hem classificat com una variable categòrica. Tal com es recull en la **taula nº1**, es defineix el dèficit com les concentracions de 25(OH)D inferiors a 20 ng/mL, la insuficiència entre 21 i 29 ng/mL i la suficiència en valors superiors o iguals a 30 ng/mL.<sup>1</sup> S'han proposat aquests punts de tall conforme a estudis previs on es valorava l'elevació de les concentracions de PTH per sota del llindar de 20 ng/mL i la disminució de l'absorció intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$  amb valors de 25(OH)D inferiors a 32 ng/mL.<sup>31</sup>

Els valors de 25(OH)D es van diferenciar segons si l'extracció sanguínia s'havia realitzat durant l'hivern (Octubre-Març) o durant l'estiu (Abril-Setembre). Les concentracions sèriques extretes durant l'hivern es van incrementar un 20% per corregir la disminució de la seva síntesi cutània durant aquest període.<sup>32</sup>

**Taula nº1.** Definició de les concentracions en sang de vitamina D.

DEFINICIONS	CONCENTRACIONS 25(OH)D
<b>Dèficit</b>	<b>&lt; 20 ng/mL</b>
<b>Insuficiència</b>	<b>21 – 29 ng/mL</b>
<b>Suficiència</b>	<b>&gt; 30 ng/mL</b>

SPECT D'ESFORÇ AMB PERFUSIÓ MIOCARDÍACA:

S'ha considerat la gammagrafia positiva (GG+) quan ha demostrat qualsevol signe d'hipoperfusió i/o isquèmia miocardiaca. Les proves sense signes d'isquèmia s'han valorat com a negatives. Només el grup de pacient diabètics ha realitzat aquesta prova.

SCORE CÀLCIC:

Hem aplicat l'estadiatge d'Agatston en el que s'estableixen cinc categories: a) zero: sense calcificació, b) 1-10: calcificació lleu, c) 11-100: calcificació moderada, d) 100-400: calcificació severa i e)  $\geq 400$ : calcificació extensa. Els resultats els hem transformat amb una variable categòrica, considerant positius els valors majors a zero i negatius aquells amb resultat igual a zero.

A la **taula nº2** queda reflectida la interpretació dels resultats de *score* càlcic.<sup>33</sup>

**Taula 2.** Directrius per a la interpretació i maneig clínic dels pacients asimptomàtics en funció de la puntuació segons l'estadiatge d'Agatston. Modificat de Rumberg & co.

VALOR	PROBABILITAT DE MALALTIA CORONÀRIA SIGNIFICATIVA	RISC CARDIOVASCULAR	RECOMANACIONS
<b>0</b>	Molt baixa	Molt baix	Tranquil·litzar
<b>1-10</b>	Molt poc probable	Baix	Recomanacions prevenció primària de la MCV
<b>11-100</b>	Probabilitat mínima o lleu d'estenosi coronària	Moderat	Modificació de FRCV; AAS/diari
<b>101-400</b>	Alta probabilitat de malaltia coronària	Moderat - Alt	Modificació de FRCV; Prova d'esforç
<b>&gt;400</b>	Alta probabilitat de malaltia coronària significativa	Alt	Modificació de FRCV; Prova d'esforç

## 6. ESTADÍSTICA

Les variables qualitatives s'han representat amb percentatges i les variables quantitatives el forma de mitja aritmètica  $\pm$  desviació estàndard (DE). Les variables amb una distribució no normal s'han expressat amb la mediana  $\pm$  percentils.

Per establir associacions entre variables qualitatives es va emprar el test de la  $\chi^2$  (amb la utilització de l'estadístic exacte de Fisher si procedia). Les variables quantitatives es compararen amb el test de la T-Student.

Per a realitzar l'anàlisi estadística es va utilitzar el *software* SPSS 17.0 per a Microsoft Windows (SPSS Inc, Chicago, Estats Units). Es considerà estadísticament significatiu un valor de p menor de 0.05.

## 7. RESULTATS

De la mostra inicial s'excloueren 5 pacients per estar realitzant tractament amb calci i vitamina D i 2 controls pacients per presentar un fototipus de pell grau IV.

Les característiques clíniques i bioquímiques basals de la mostra es recullen a la **taula nº3** (els valors s'expressen en mitja aritmètica  $\pm$  desviació estàndard i en mediana  $\pm$  percentils si s'escau).

**Taula nº3.** Característiques basals de la mostra.

Edat (A)	38,01 $\pm$ 7,81
Sexe (n, H/D)	111 (57%) / 82 (43%)
IMC (pes/talla <sup>2</sup> )	25,23 $\pm$ 3,63
Anys d'evolució (A)	20,75 $\pm$ 8,29
HbA1c (%)	8,06 $\pm$ 1,14
ColT (mg/dL)	185,54 $\pm$ 27,48
HDLc (mg/dL)	60,87 $\pm$ 15,46
LDLc (mg/dL)	107,59 $\pm$ 25,28
Tg (mg/dL)	64,0 (52,0 – 91,0)
PCR (mg/L)	1,03 (0,65 – 2,50)
Ca <sup>2+</sup> (mg/dL)	9,26 $\pm$ 0,67
PO <sup>3-</sup> (mg/dL)	3,64 $\pm$ 0,77
25(OH)D (ng/mL)	20,98 $\pm$ 8,05
Tabaquisme (n/%)	95 (49,2%)
Score > 1 (n/%)	28 (14,5%)
GG+ (n/%)	15 (14,2%)
25(OH)Dcor $\leq$ 20 ng/mL (n/%)	67 (40,1%)

Els casos presentaven una llarga evolució de la diabetis mellitus tipus 1 amb una mitja de 20,8 anys (mínim 10 i màxim 47 anys). En la comparació dels casos i els controls no es detectà diferències significatives en l'edat ni en l'IMC que podrien interferir en les concentracions de la vitamina D com s'ha exposat anteriorment.

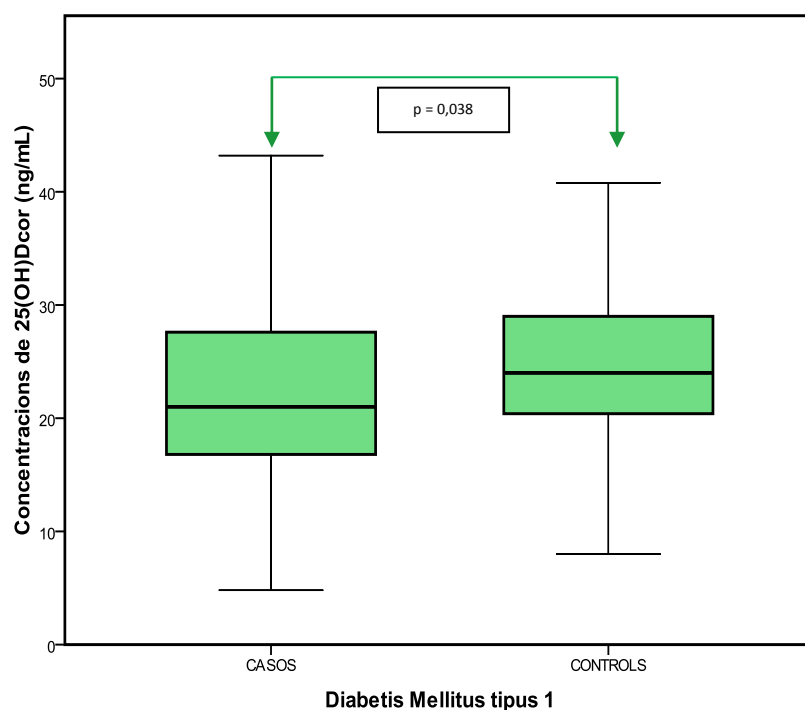
Les característiques clíniques i bioquímiques tant dels casos com dels controls queden representades en la **taula n<sup>o</sup>4**.

**Taula n<sup>o</sup>4.** Característiques clíniques i bioquímiques de la casos i controls.

	DM1	NO DIABÈTICS	SIGNIFICACIÓ
Nombre (n/%)	145 (75%)	48 (25%)	--
Edat	37,83 ± 8,04	38,54 ± 7,12	NS
Sexe (H/D)	83/62 (57/43%)	28/20 (58/42%)	NS
IMC (pes/talla <sup>2</sup> )	25,20 ± 3,51	25,43 ± 4,43	NS
HbA1c (%)	8,06 ± 1,14	5,42 ± 0,21	p < 0,00
ColT (mg/dL)	183,53 ± 24,63	191,62 ± 34,33	NS
HDLc (mg/dL)	60,57 ± 15,14	61,76 ± 16,53	NS
LDLc (mg/dL)	106,1 ± 21,82	112,17 ± 33,46	NS
Tg (mg/dL)	63,5 (52,0 – 91,5)	64,0 (50,0 – 91,5)	NS
PCR (mg/dL)	1,03 (0,66 – 2,38)	0,96 (0,57 – 3,10)	NS
Ca <sup>2+</sup> (mg/dL)	9,20 ± 0,74	9,43 ± 0,33	p < 0,01
PO <sup>3-</sup> (mg/dL)	3,61 ± 0,84	3,72 ± 0,57	NS
25(OH)D (ng/mL)	20,39 ± 8,23	22,58 ± 7,41	NS
25(OH)Dcor (ng/mL)	22,43 ± 8,96	25,73 ± 8,96	p < 0,05
Score > 1 (n/%)	24 (16,6%)	4 (8,3%)	
GG+ (n/%)	15 (14,2%)	--	--
PTH (pg/mL)	39,2 ± 17,54	37,15 ± 17,92	NS
Tabaquisme (n/%)	76 (52,4%)	19 (39,6%)	NS
Retinopatia (n/%)	25 (23,1%)	--	--
Nefropatia	11 (10,2%)	--	--

Dels 193 subjectes de l'estudi, un 40,1% presentava dèficit de vitamina D (25(OH)D < 20 ng/mL), un 14,2% un SPECT d'esforç amb una gammagrafia alterada i un 14,4% un score càlcica > 1 AU.

El grup amb DM1 presentava unes concentracions de 25-hidroxivitamina D corregida (25(OH)Dcor) menors amb una mitja  $22,43 \pm 8,96$  (ng/dL) respecte el grup control no diabètic,  $25,73 \pm 8,96$  (ng/dL). Aquesta diferència fou significativa amb una  $p = 0.038$  (Figura 1).



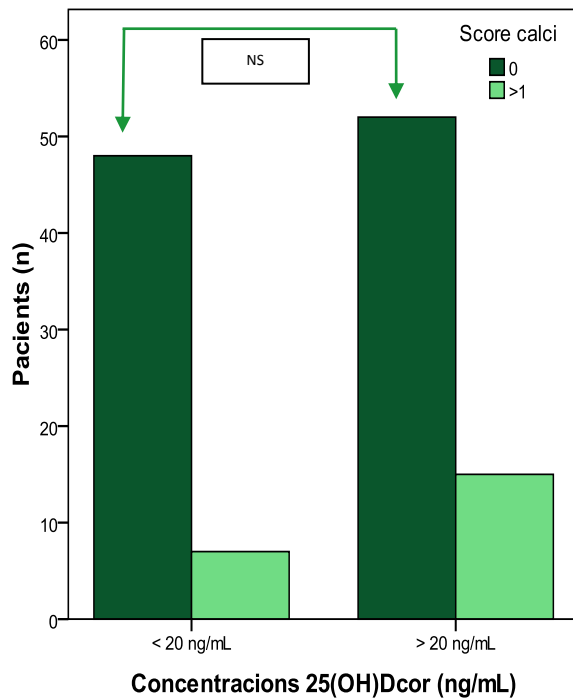
**Figura 1.** Concentracions de vitamina D, corregides segons data d'extracció, en casos i controls.

Considerant els valors inferiors a 20 ng/mL com a dèficit, es va observar que el percentatge dels pacients DM1 amb dèficit fou significativament superior respecte els controls, amb una  $p = 0.031$ .

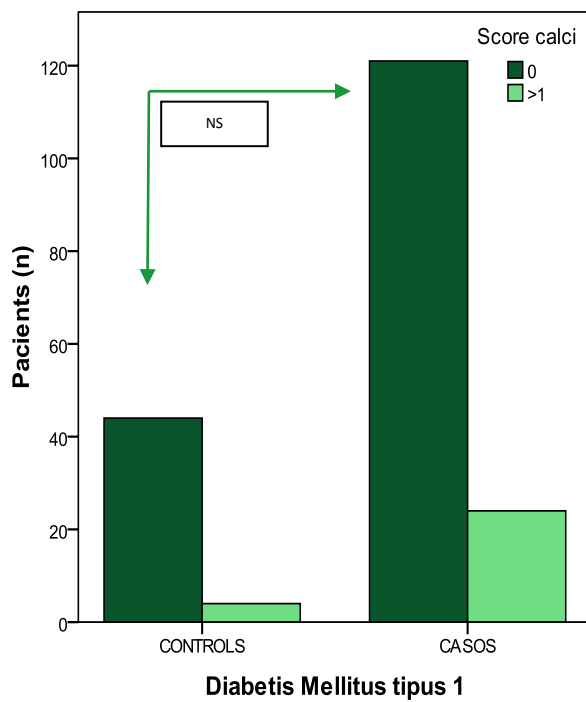
**Taula nº5.** Dèficit de vitamina D en casos i controls.

	DIABÈTIS MELLITUS 1	NO DIABÈTICS	TOTAL
25(OH)DCOR ≤ 20 (ng/mL)	55 (45,1%)	12 (26,7%)	67 (40,1%)
25(OH)DCOR > 20 (ng/mL)	67 (54,9%)	33 (73,3%)	100 (59,9%)
TOTAL	122 (100%)	45 (100%)	167 (100%)

Les resultats del *score* calci es van comparar entre ambdós grups i en funció de les concentracions de vitamina D corregida. No es detectaren diferències significatives tal i com es mostra en la figura 2 i 3.



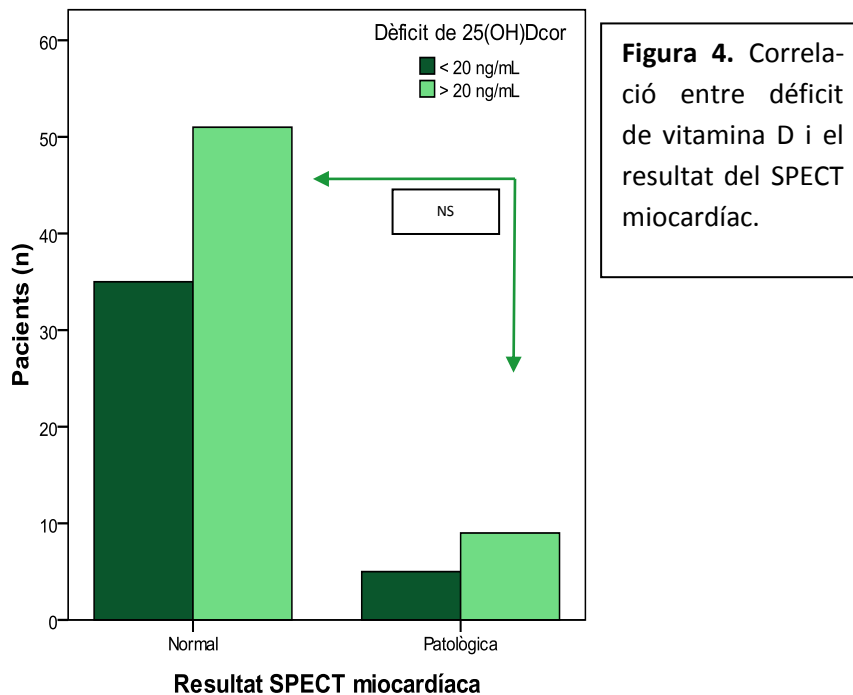
**Figura 2.** Correlació entre el déficit de vitamina D i el resultat del *score* calci.



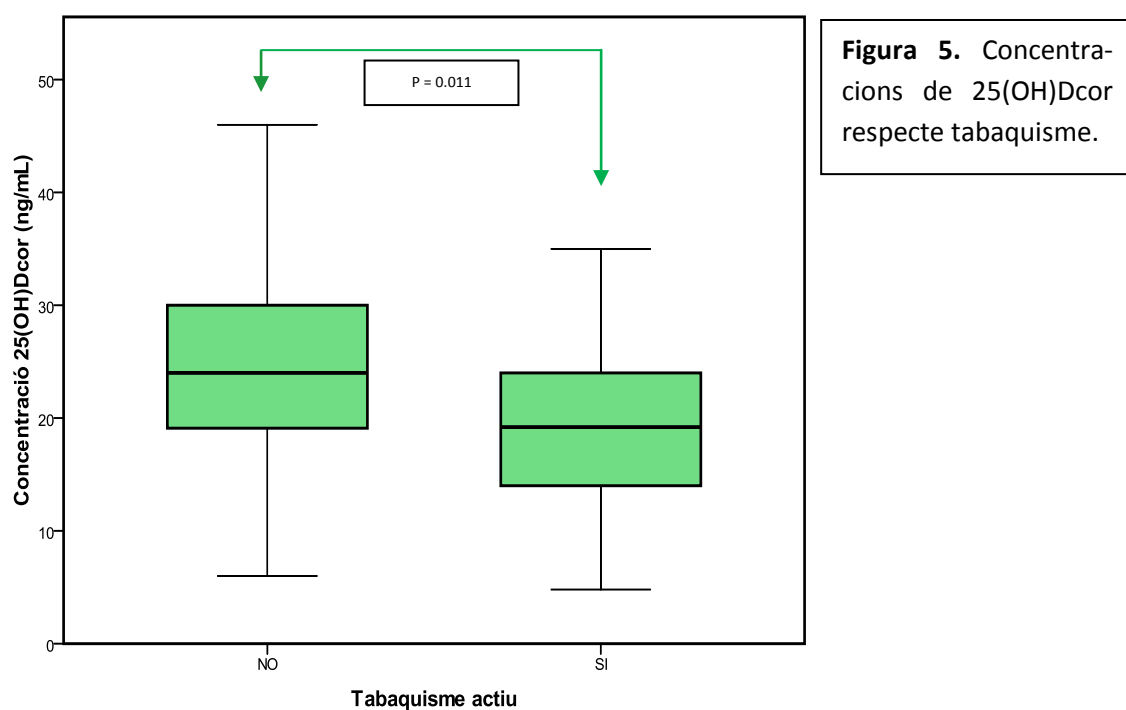
**Figura 3.** Correlació entre casos i controls i el resultat del *score* calci



Paral·lelament els resultats del SPECT de perfusió miocardiàica es van comparar entre els diabètics amb o sense dèficit de vitamina D. Novament no es detectaren diferències significatives.



Finalment es va detectar que els pacients fumadors presentaven una concentració menor de 25(OH)D i uns resultats del *score* càlcic pitjors que els pacients no fumadors. Ambdós resultats presentaren significació estadística.



## 8. DISCUSSIÓ

La milloria substancial en el tractament i seguiment de la DM1 ha permès endarrerir l'aparició de les complicacions cròniques microvasculars de la diabetis que condicionen en gran mesura l'evolució de la malaltia. Tot i l'esforç de la comunitat científica la millora no és tan clara en les complicacions macrovasculars. Fins i tot, en estudis realitzats en DM2 com l'ACCORD,<sup>34</sup> s'objectiva l'aparició d'incidents cardiovasculars en relació a les hipoglicèmies derivades d'una estratègia de control glicèmic estricta.

Aquests fets reflecteixen que dins la fisiopatologia de la malaltia cardiovascular en la diabetis intervenen més factors que únicament el control glicèmic. Hi ha un interès creixent en identificar aquests mecanismes. S'ha postulat que les alteracions de la PTH, la vitamina D i el calci podrien estar implicades en la disfunció endotelial, l'estat proinflamatori i la tendència a la calcificació de les coronàries d'aquests pacients.<sup>24</sup>

Hi ha estudis que han comprovat que un dèficit de vitamina D s'associa a un increment de la PTH, de la calcèmia i a disregulacions del sistema immunitari.<sup>22,23,26</sup>

La MAC és la principal causa de morbiditat i mortalitat dels pacients diabètics. En les complicacions microvasculars estan ben establertes les proves de cribratge que cal realitzar (microalbuminúria, fons d'ull) però no queda clar quina és la prova d'elecció en el cribratge de la malaltia isquèmica silent en pacients asimptomàtics.

En el nostre estudi es va plantejar correlacionar els nivells de vitamina D i dues proves de detecció precoç cardiovascular en un grup de pacients diabètics i en un grup control no diabètic. Es van utilitzar dues proves: el SPECT cardíac com a prova àmpliament validada i el *score* càlcic.

El primer repte va ser acotar quina concentració de 25(OH)D es considerava dèficit de vitamina D. Recentment s'ha publicat la guia del maneig de la carència de vitamina D per la Endocrine Society en què, tot i la falta de consens, s'ha considerat dèficit els valors inferiors a 20 ng/mL atenent la concentració de PTH, l'absorció de calci i el risc de fractura.<sup>1,33</sup> En el nostre estudi s'ha corregit el dèficit de producció cutània de vitamina D a l'hivern incrementant en un 20% els resultats analítics extrets en el

període comprès entre octubre i març.<sup>31</sup> Paral·lelament s'han exclòs els pacients que realitzaven tractament amb calci, vitamina D o presentaven un fototipus de pell IV o V.

Un cop establert el criteri diagnòstic s'ha detectat que en el nostre estudi, el 40,1% de la mostra presentava uns nivells de 25(OH)D inferiors als 20 ng/mL, dels què un 82,1% eren diabètics. La nostra proporció de dèficit de vitamina D és similar a alguns estudis (45.9%<sup>38</sup>) però molt superior a la d'altres (10%<sup>16</sup>). Aquest fet denota una important variabilitat on influeixen factors com la latitud, els hàbits alimentaris,<sup>36</sup> l'ètnia i l'exposició solar diària.

Els pacients diabètics han presentat unes concentracions de vitamina D inferiors respecte el grup control i una major proporció d'insuficiència de vitamina D, de forma similar a altres estudis realitzats en pacients diabètics.<sup>36</sup> Ambdós resultats han presentat significació estadística. És difícil determinar la causa donat que no disposem d'enquesta alimentària que registri la ingesta de calci i vitamina D. Altres estudis han assumit un origen alimentari d'aquest fet.<sup>37</sup>

Paral·lelament, destaca una major proporció de fumadors entre els pacients amb dèficit de vitamina D (25(OH)Dcor < 20 ng/mL) amb una  $p = 0.02$ , que ja ha estat descrita a la literatura.<sup>38,39</sup>

Quan s'han relacionat els resultats del *score* càlcic, del SPECT de perfusió miocardiàica i les concentracions de 25(OH)Dcor, a diferència d'altres treballs<sup>10,15,16,20</sup> no s'han trobat diferències significatives entre els grups cas i control ni entre els grups amb dèficit o no dèficit de 25(OH)Dcor. En la nostra mostra el percentatge de proves cardiovasculars alterades va ser inferior en relació a altres estudis.<sup>14,15,16</sup> Tot i que la proporció del *score* càlcic igual a zero en pacients diabètics fou inferior respecte el grup control, aquestes diferències no van resultar estadísticament significatives.

Existiria la possibilitat que els pacients DM1 de la nostra àrea tinguin un millor control dels FRCV que els controls per realitzar un seguiment mèdic més estricte o podria tractar-se d'un nou exemple de la paradoxa de l'àrea mediterrània on la prevalença de malaltia cardiovascular és inferior a regions del nord d'Europa.

## 9. CONCLUSIÓ

Els resultats del nostre estudi indiquen que les concentracions de 25(OH)D, corregides per data d'extracció, dels pacients afectes de DM1 són inferiors respecte pacients no diabètics. Així mateix, s'ha detectat una major proporció de fumadors entre aquells que presenten unes concentracions de 25(OH)D<sub>cor</sub> < 20 ng/mL.

En comparar les proves de detecció precoç de MAC (*score* calci i SPEC de perfusió miocardiàica) en pacients diabètics, no diabètics, deficitaris i no deficitaris de 25(OH)D, no s'han detectat diferències estadísticament significatives.

És imperatiu realitzar noves recerques per corroborar o descartar els resultats obtinguts en el nostre estudi atesa la incidència creixent de la DM1, la morbimortalitat associada a la MAC i la important prevalença del dèficit de vitamina D.

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin d deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline.
2. Javier Aranceta & co. Prevalencia de la obesidad en España: resultados del estudio SEEDO 2000. Med Clin (Barc) 2003;120(16):608-12
3. Javier Aranceta-Bartrina & co. Prevalencia de obesidad en España. Estudio SEEDO 2005. Med Clin (Barc). 2005;125(12):460-6
4. J. L. Gutiérrez-Fisac, Guallar-Castillón P, León-Muñoz LM, Graciani A, Banegas JR, Rodríguez-Artalejo. Prevalence of general and abdominal obesity in the adult population of Spain, 2008–2010: the ENRICA study. F. Rev Esp Cardiol. 2012 Jun;65(6):551-8. Epub 2012 Apr 5.
5. Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre Diabetes mellitus tipo 1. Guía de Práctica Clínica sobre Diabetes mellitus tipo 1. Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad y Política Social. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del País Vasco-Osteba; 2012.
6. Prevalencia de Diabetes en España: Estudio Di@bet.es. Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (ISCIII, Ministerio de Ciencia e Innovación, España) y la Sociedad Española de Diabetes-SED. Octubre del 2011.
7. Patterson CC, Dahlquist GG & co. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. Lancet. 2009 Jun 13;373(9680):2027-33. Epub 2009 May 27.
8. Jaume Marrugat, Isaac Subirana & co. Validity of an adaptation of the Framingham cardiovascular risk function: the VERIFICA study. J. Epidemiol Community Health 2007;61: 140-47
9. Estándares para la atención médica de la diabetes - 2012. American Diabetes Association. Estándares para la atención médica de la diabetes. Diabetes Care; 35 (Supp 1) Januray 2012

10. Eve Roelker & co. Screening for coronary artery disease in patients with diabetes. *Diabetes Spectrum*. Volume 21, Number 3, 2008.
11. Tablas de Framingham de estimación de riesgo coronario a 10 años adaptadas a la población española. REGICOR. Registro Gironí del Cor.
12. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Calle-Pascual A, Carmena R & co. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia*. 2012;55:88–93
13. Young LH, Wackers FJ & co. Screening for asymptomatic coronary artery disease with myocardial perfusion imaging does not reduce cardiovascular events in middle-aged and older patients with diabetes. *Clinical Diabetes*, Volume 27, Number 3, 2009
14. Olson JC, Edmundowicz D & co. Coronary calcium in adults with type 1 diabetes: a stronger correlate of clinical coronary artery disease in men than in women. *Diabetes* 2000;49: 1571–1578
15. Dabelea D, Kinney G & co. Coronary artery calcification in Type 1 Diabetes study effect of type 1 diabetes on the gender difference in coronary artery calcification: a role for insulin resistance? The Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes (CACTI) Study. *Diabetes* 2003;52: 2833–2839
16. Kendra A. Young, Janet K. Snell-Bergeon & co. Vitamin D deficiency and coronary artery calcification in subjects with type 1 Diabetes. *Diabetes Care*, Volume 34, February 2011.
17. Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, Shaw AC, Deraska DJ, Kitch BT, Vamvakas EC, Dick IM, Prince RL, Finkelstein JS. Hypovitaminosis D in medical inpatients. *N Engl J Med*. 1998;338:777–783.
18. Bouillon R, Carmeliet G & co. Vitamin D and human health: Lessons from Vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 2008;29:726 – 76.
19. Mathieu C, Waer M, Laureys J, Rutgeerts O, Bouillon R. Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Diabetologia*. 1994; 37(6):552-8
20. Luong K, Nguyen LT, Nguyen DN. The role of vitamin D in protecting type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*. 2005; 21(4):338-46

21. Zipitis CS, Akobeng AK & co. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. Arch Dis Child 2008;93:512-517
22. Cantorna MT. Vitamin D and autoimmunity: is vitamin D status an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence? Proc Soc Exp Biol Med. 2000; 223(3):230-3
23. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL & co. Vitamin D Deficiency and Risk of Cardiovascular Disease. Circulation 2008;117:503-511.
24. Elamin MB, Elnour NOA, Elamin KB & co. Vitamina D y efectos cardiovasculares: revisión sistemática y metaanálisis. Educación diabetológica profesional. Volumen XXII, Número 1, 2012.
25. Oh J, Weng S & co. 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D inhibits foam cell formation and suppresses macrophage cholesterol uptake in patients with type 2 diabetes mellitus. Circulation 2009;120:687 – 98.
26. Elamin MB, Abu Elnour NO & co. Vitamin D and Cardiovascular Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. JCEM 96:0000-0000, 2011.
27. Bolland MJ, Grey A & co. Calcium and vitamin D supplements and health outcomes: a reanalysis of the Women's Health Initiative (WHI) limited-access data set. Am J Clin Nutr 2011;94:1144 – 9.
28. Bolland MJ, Avenell A & co. Effect of calcium supplements on risk of myocardial infarction and cardiovascular events: meta-analysis. BMJ 2010;341:C3691.
29. Avenell A, MacLennan GS & co. Oral vitamin D3 and calcium for secondary prevention of low-trauma fractures in elderly people (Randomised Evaluation of Calcium Or vitamin D, RECORD): a randomised placebo-controlled trial. JCEM 2012;97:614 – 22.
30. Reid IR, Bolland MJ. Role of vitamin D deficiency in cardiovascular disease. Heart 2012.
31. Holick MF & co. Vitamin D status: measurement, interpretation and clinical application. Ann Epidemiol. 2009 February ; 19(2): 73–78.
32. Clifford J, Rosen MD & co. Vitamin D Insufficiency. N. Engl. J. Med. 364; 3. NEJM.ORG. January 20, 2011.

33. Bastarrika G, Cano D & co. TC multicorte (TCMC) cardiaca: aplicaciones clínicas. Multislice CT of the heart: clinical applications. An. Sist. Sanit. Navar. 2004, Vol. 27, Nº 1, enero-abril.
34. Buse JB, Bigger J & co. Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) trial: design and methods. TAm J Cardiol. 2007 Jun 18;99(12A):21i-33i.
35. Bener A, Alsaied A & co. Impact of lifestyle and dietary habits on hypovitaminosis D in type 1 diabetes mellitus and healthy children from Qatar, a sun-rich country. Ann Nutr Metab. 2008;53(3-4):215-22. Epub 2008 Dec 12.
36. Greer RM, Portelli SL & co. Serum vitamin D levels are lower in Australian children and adolescents with type 1 diabetes than in children without diabetes. Pediatr Diabetes. 2012 Aug 23.
37. Cutillas-Marco E, Fuertes-Prosper A & co. Vitamin D deficiency in South Europe: effect of smoking and aging. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2012 Jun;28(3):159-61.